

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年9月1日 (01.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/080572 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/53,
1/19, 9/02, 9/00, C12P 33/06 // (C12N 15/53, C12R 1:91)
(C12N 1/19, C12R 1:645) (C12N 9/02, C12R 1:645)
(C12P 33/06, C12R 1:645)

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI, Shohei et al.); 〒1076013 東京都港区赤坂一丁目12番32号アーク
森ビル13階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003205

(22) 国際出願日: 2005年2月25日 (25.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-049123 2004年2月25日 (25.02.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 明治製
菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒
1048002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo
(JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 林 宏明
(HAYASHI, Hiroaki) [JP/JP]; 〒5028585 岐阜県岐阜
市三田洞東5-6-1 岐阜薬科大学内 Gifu (JP). 井
上 謙一郎 (INOUE, Kenichiro) [JP/JP]; 〒5028585 岐
阜県岐阜市三田洞東5-6-1 岐阜薬科大学内 Gifu
(JP). 星野 雅輝 (HOSHINO, Masateru) [JP/JP]; 〒
1130033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院
内 Tokyo (JP). 渋谷 雅明 (SHIBUYA, Masaaki) [JP/JP];
〒1130033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大
学院内 Tokyo (JP). 海老塚 豊 (EBIZUKA, Yutaka)

[JP/JP]; 〒1130033 東京都文京区本郷7-3-1 東京
大学大学院内 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: TRITERPENE HYDROXYLASE

A1 (54) 発明の名称: トリテルペン水酸化酵素

(57) Abstract: Soyasapogenol B is biologically synthesized via two-step hydroxylation of β -amyrin which is its precursor. However, a gene of the hydroxylase participating in this reaction has not been clarified so far. Therefore, this hydroxylase cannot be utilized in the genetic engineering. It is found out that a sequence corresponding to a soybean-origin cytochrome P450 gene CYP93E1 encodes an enzyme protein which hydroxylates oleanane triterpene at the 24-position. Thus, a method of utilizing this gene by using a genetic engineering means is provided.

(57) 要約: ソヤサポゲノールBは前駆体である β -アミリンの2段階の水酸化反応を経て生合成される。しかしながら、この反応に関与する水酸化酵素の遺伝子は明らかにされていなかった。そのため、水酸化酵素についての遺伝子工学的な利用が不可能であった。発明者らは、ダイズ由来のシトクロームP450遺伝子CYP93E1に対応する配列がオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する酵素タンパクをコードしていることを明らかにするとともに、当該遺伝子を遺伝子工学的な手段を用いて利用する方法を提供する。

WO 2005/080572

明 細 書

トリテルペン水酸化酵素

技術分野

[0001] 本発明は、植物由来のソヤサポゲノールB生合成に関する酵素遺伝子を遺伝子工学的な手法を用いて形質転換した細胞、ならびにその細胞を利用することによりソヤサポゲノールBを製造する方法に関する。

背景技術

[0002] ソヤサポゲノールB(12-oleanene-3,22,24-triol)は、大豆種子より単離、構造決定されたオレアナン骨格を有するトリテルペン(Chem. Pharm. Bull., 24, p121-129, 1976、Chem. Pharm. Bull., 30, p2294-2297, 1982) (非特許文献1および2)であり、その配糖体であるソヤサポニンはマメ科植物に広く分布している。

これまでにソヤサポゲノールBに関しては、抗補体活性、血小板凝集抑制作用(特開昭61-37749) (特許文献1)、抗腫瘍活性(特開平10-234396) (特許文献2)および肝保護作用(Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, 85-88, 1997) (非特許文献3)などが報告されており、医薬品もしくは医薬品原料としての有用性が期待されている。

[0003] ソヤサポゲノールBの製造法としては、大豆種子に含有されるサポニンの糖鎖を加水分解したのち、ソヤサポゲノールBを精製する方法が知られているが、大豆種子に含有されているサポニンの割合は約0.2% (薬学雑誌104, 162-168, 1984) (非特許文献4)と少なく、より効率的な製造法が求められている。

ソヤサポゲノールBの生合成前駆体であるβ-アミリンは、メバロン酸経路により生成した2, 3-オキシドスクアレンが閉環することにより生合成され、その後、2段階の水酸化反応を経てソヤサポゲノールBが生合成されると推定される。

[0004] ソヤサポゲノールBと構造的に類似するソフォラジオール(12-oleanene-3,22-diol)は槐花(エンジュ)の成分として報告されている物質(薬学雑誌78, 1090-1094, 1958) (非特許文献5)であるが、このソフォラジオールの24位を水酸化するとソヤサポゲノールBを生産することが可能である。

実際、カンゾウの培養細胞由来の水酸化酵素を利用して、ソフォラジオールの24位

を水酸化することによる、ソヤサポゲノールBの製造法が開示されている。(

WO02/086142) (特許文献3)

[0005] 特許文献1:特開昭61-37749号公報

特許文献2:特開平10-234396号公報

特許文献3:国際公開WO02/086142号公報

非特許文献1:Chem. Pharm. Bull., 24, p121-129, 1976

非特許文献2:Chem. Pharm. Bull., 30, p2294-2297, 1982

非特許文献3:Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, 85-88, 1997

非特許文献4:薬学雑誌104, 162-168, 1984

非特許文献5:薬学雑誌78, 1090-1094, 1958

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] ソヤサポゲノールBの生合成前駆体である β -アミリンは、メバロン酸経路により生成した2, 3-オキシドスクアレンが閉環することにより生合成され、その後、2段階の水酸化反応を経てソヤサポゲノールBが生合成される。しかしながら、この反応に関与する水酸化酵素の遺伝子は明らかにされていなかった。そのため、水酸化酵素についての遺伝子工学的な利用が不可能であった。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、 β -アミリンからソヤサポゲノールBに至る生合成に関するシトクロームP450型の酵素の遺伝子が、ソヤサポゲノールBの配糖体であるソヤサポニンを高生産するダイズのEST(Expression Sequence Tags)クローンや機能未同定クローンの中に含まれていると考え、ラノステロール欠損酵母変異株を用いて、これらダイズのクローンの機能解析を行った。解析を行ったクローンのうち配列番号8で表されるポリヌクレオチドを転写及び翻訳させた酵母において本来検出されないオレナン型トリテルペンの24位の水酸化活性を検出した。水酸化活性を検出した酵素のポリヌクレオチド配列は配列番号8であり、推定されるポリペプチド配列は配列番号9である。配列番号8に類似する配列として、シトクロームP450遺伝子CYP93E1 (Gen Bank Accession Number AF135485、配列番号10、推定されるポリペプチド

配列は配列番号11)が知られている。配列番号8で表されるポリヌクレオチドと配列番号10で表されるポリヌクレオチドは、121番目、171番目および1081番目の3箇所が異なる。(以下、配列番号8で表される配列もシトクロームP450遺伝子CYP93E1と呼ぶことがある。)また、配列番号9で表されるポリペプチドと配列番号11で表されるポリペプチドは、41番目および61番目のアミノ酸が異なる。本発明者らは、配列番号8で表されるポリヌクレオチドがオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する酵素タンパクをコードしていることを明らかにした。この知見に基づき、本発明者らは鋭意努力し、本発明を完成させた。

[0008] 従って、本発明は以下の1～17に関する。

1. 配列番号8で表されるポリヌクレオチドの相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
2. ポリヌクレオチドが配列番号8で表されるポリヌクレオチドである上記1に記載の発現ベクター。
3. 上記1または2記載の発現ベクターで宿主を形質転換した形質転換体。
4. 宿主が微生物である上記3記載の形質転換体。
5. 微生物が酵母である上記4記載の形質転換体。
6. 配列番号8で表されるポリヌクレオチドの相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび β -アミリン合成酵素遺伝子を有する発現ベクター。
7. ポリヌクレオチドが配列番号8で表されるポリヌクレオチドである上記6に記載の発現ベクター。
8. 上記6または7記載の発現ベクターで宿主を形質転換した形質転換体。
9. 宿主が微生物である上記8記載の形質転換体。
10. 微生物が酵母である上記9記載の形質転換体。
11. 受託番号FERM BP-10201として寄託されているラノステロール合成酵素欠損酵母変異株。

12. 上記3から5のいずれかに記載の形質転換体を培養して、上記1に記載のポリペプチドを產生する工程を含むオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドを製造する方法。

13. 上記8から10のいずれかに記載の形質転換体を培養して、

1) 上記3に記載のポリペプチドを產生する工程および

2) β -アミリン合成酵素を產生する工程

を含むオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドおよび β -アミリン合成酵素を製造する方法。

14. 上記3から5のいずれかに記載の形質転換体をオレアナン型トリテルペンに作用させる工程を含む24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンの製造方法。

15. 上記8から10のいずれかに記載された形質転換体の培養生産による24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンの製造方法。

16. 上記11に記載の酵母変異株の培養生産による24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンの製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明により、オレアナン型トリテルペンの24位水酸化酵素の遺伝子塩基配列ならびにアミノ酸配列を明らかにすることができます。さらに、当該遺伝子を遺伝子工学的に利用することにより、遺伝子産物である酵素タンパクを大量に生産することができる。

また、生産された酵素タンパク質又は該酵素タンパク質含む形質転換体を用いて、トリテルペンの24位を水酸化することが可能となった。また当該遺伝子と β -アミリン合成酵素の遺伝子で形質転換体を用いることにより、24位が水酸化されたトリテルペンを直接培養生産することが可能となった。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明におけるオレアナン型トリテルペンとしては、 β -アミリン、ソフォラジオール、ソヤサポゲノールAおよびBなどが知られているが、本発明におけるオレアナン型トリテルペンは上記に限定されない。

24位が水酸化されるオレアナン型トリテルペンとしては、 β -アミリンやソフォラジオ

ールがあげられるが、本発明の方法により24位が水酸化される化合物であれば上記に限定されない。24位が水酸化されたトリテルペンとしては、ソヤサポゲノールAおよびBがあげられるが、本発明による酸化成績体であればソヤサポゲノールAおよびBに限定されない。

本発明によれば、シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチドおよびその均等体の転写・翻訳産物を利用して24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを製造することができる。なお、均等体とは、同一機能を有し、シトクロームP450遺伝子CYP93E1に記載の配列の相補鎖にストリンジエントな条件下でハイブリダイズする配列を指す。

[0011] 「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする」とは、シトクロームP450遺伝子CYP93E1で表される塩基配列を有するDNAの一部又は全部(又は、その相補鎖)をプローブとして、ハイブリダイズを使用する手法(例えば、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンプロットハイブリダイゼーション法等)を用いることによりヌクレオチドのハイブリダイゼーションが確認できる。具体的には、0.5mol/lの塩化ナトリウム存在下、55°Cでハイブリダイゼーションを行った後、2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウム、pH7.0よりなる)を用いる場合が例示される。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis(トマス・マニアティス)他著、cold spring harbor laboratory、1989年発行)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST (National Center for Biotechnology Information)を用いて計算したときに、シトクロームP450遺伝子CYP93E1で表される塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。なお、本発明における相同性は、BLASTのパラメータをWordsize:3、Matrix:BLOSUM62、Gap Costs:Existence:11、Extension:1に設定したときの数値を表す。

また、「シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチドの相補鎖とストリンジエ

ントな条件下でハイブリダイズし、かつオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、具体的には、シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチド配列において、1若しくは複数のヌクレオチドが欠失、置換、挿入若しくは付加され、かつ、オレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。シトクロームP450遺伝子CYP93E1のヌクレオチド配列において置換されるヌクレオチドの個数は、上記の相同性を満たし、かつ、オレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードする数であれば特に限定されない。

シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチドに対する変異は、自然界において生じる変異のほかに、人為的な変異も含む。人為的に変異させる手段としては、シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチドを用いて、ランダム変異あるいは部位特異的変異を導入し、遺伝子工学的に、1又は複数のヌクレオチド残基が欠失、置換、挿入、付加の少なくとも1つがなされているポリヌクレオチドを得る方法が挙げられる。こうして得られた変異ポリヌクレオチドを利用することにより、本酵素の活性の至適温度、熱安定性、至適pH、pH安定性、基質特異性等の性質が異なったポリペプチドを得ることが可能となる。

さらに、24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを產生し得る他の微生物、植物、及び、動物(好ましくはオレアナン型トリテルペン產生し得る、植物、より好ましくはマメ科植物、最も好ましくは大豆)に対してシトクロームP450遺伝子CYP93E1の塩基配列を有するヌクレオチドの一部又は全部(又は、その相補鎖)をプローブとして、ハイブリダイズを使用する手法(例えば、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法)、または、シトクロームP450遺伝子CYP93E1の塩基配列を有するヌクレオチドの一部又は全部(又は、その相補鎖)をプライマーとしてPCRを行う手法等によって、シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチドの相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得ることもできる。

また、上記ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列の情報を基にして、化学合成によつ

て得ることもできる。この方法は、ジーン(Gene)、第60(1)巻、第115-127頁(1987)の記載を参照して行うことができる。

[0012] さらに、本発明は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチドおよびその均等体を保持する、及び／又は、発現するための自立複製可能なベクター(好ましくは発現ベクター)で宿主を形質転換した形質転換体に関する。該ベクターは、シトクロームP450遺伝子CYP93E1のポリヌクレオチドおよびその均等体に加え、さらに β -アミリン合成酵素遺伝子を含んで良い。

[0013] 宿主の例としては、特に限定されないが、微生物、植物、動物等が挙げられる。微生物としては、酵母、大腸菌等が挙げられ、好ましくは酵母が用いられる。動物としてはカイコがあげられる。植物としては大豆があげられる。植物に本発明のベクターを導入する事で、24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンの含量の増加した植物を提供可能である。

[0014] 形質転換する酵母の例としては、ラノステロールシンターゼを欠いた酵母GIL77(Kushiro, T. et al., *Eur. J. Biochem.*, 256, 238-244, 1998)がある。上記シトクロームP450遺伝子CYP93E1に対応するcDNA及びエンドウ由来 β -アミリン合成酵素遺伝子を酵母発現ベクターpESC-ERA(Stratagene社製)に組込み、ラノステロール合成酵素を欠いた酵母GIL77を形質転換し、2種の遺伝子を共発現させることにより、24位が水酸化されたトリテルペンを培養生産することが可能となる。

[0015] 発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

[0016] 宿主細胞が微生物である場合、発現ベクターとしては、例えば、pBluescript(STRATAGENE社製)、pUC18(タカラバイオ社製)、pUC118(タカラバイオ社製)、pUC19(タカラバイオ社製)、pUC119(タカラバイオ社製)等を例示することができる。プロモーターとしては、大腸菌、糸状菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(P_{trp})、lacプロモーター(P_{lac})等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、タカラミラーゼ遺伝子プロモーター、TEF1遺伝子プロモーター等の酵母等に由来するプロモーター等を挙げることがで

きる。

また、人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へポリヌクレオチドを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]等を挙げることができる。

[0017] 酵母菌株が宿主細胞である場合には、発現ベクターとして、例えばpAUR101(タカラバイオ社製)、pAUR112(タカラバイオ社製)、pI-RED1(東洋紡績社製)等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよい。

例えば、解糖系酵素遺伝子プロモーター、Galプロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にポリヌクレオチドを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法[ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.)、153, 163 (1983)]等を挙げることができる。

[0018] 宿主細胞の培地、培養条件については、公知の方法に従って適宜選択することができる。微生物を宿主細胞とする場合、得られた形質転換体を培養する培地は、該微生物が資化しうる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、ポテトデキストロース、グルコース、スクロース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等を用いることができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機塩若しくは有機酸のアンモニウム塩その他の窒素化合物、ペプトン、酵母エキス、コーンスティープリカー、カゼイン加水分解物、肉エキスを用いることができる。無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いるこ

とができる。

[0019] 宿主細胞がカイコである場合、例えばバキュロウイルス発現系を用いた公知の方法により、本発明のポリペプチドを発現させることができる。[Appl. Microbiol. Biotechnol., 62, 1-20(2003)]また、植物細胞を宿主として本発明のポリペプチドを形質転換した植物を得る場合、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのTiプラスミドまたはバイナリープラスミド系、アグロバクテリウム・リゾジエネスのRiプラスミド、ポリエチレングリコールを用いる直接的な遺伝子伝達またはエレクトロポレーション法が有効である。[Methods in Molecular Biology, 267, Recombinant Gene Expression 329-50(2004)]

[0020] また、誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターを導入した形質転換体を培養する場合には、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた場合はイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた場合はインドールアクリル酸等を培地に添加することができる。

[0021] なお、本発明のポリペプチドの発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法等に準じて行うことができる。

[0022] 上記3-5記載の形質転換体を使用してオレナン型トリテルペン24位水酸化体を製造する場合、形質転換体の培養液に基質となるオレナン型トリテルペンを添加して培養し、得られた24位水酸化体を酢酸エチルやエーテルなどの有機溶媒で抽出後、シリカゲルやODSを用いて精製する。

[0023] また、形質転換体の培養液から無細胞抽出液を調製してオレナン型トリテルペン24位水酸化体を製造することもできる。この場合、収穫した細胞を懸濁液に懸濁し、ホモジナイザー、超音波破碎機あるいはフレンチプレス等により細胞を破碎後、遠心分離して無細胞抽出液を得る。緩衝液には、ポリペプチドの失活を防ぐため、抗酸化剤、酵素の安定化剤、ポリフェノール吸着剤、金属配位子などを添加することができる。さらに比活性を高めるにはポリペプチドを精製することが有効であり、超遠心機による遠心分離法、硫安等による塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティクロマトグラフィー法、電気泳動法などの手法を単独で、あるいは組み合わせて用いることができる。

[0024] 得られたポリペプチドを含む緩衝液に、基質となるオレアナン型トリテルペンならびに補酵素を添加して、15—40°C、好ましくは20—37°Cでインキュベートする。補酵素としてはNADHあるいはNADPHが利用でき、グルコース-6-リン酸とグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを用いたNADPH再構成系も併用できる。また、形質転換細胞が產生するNADPH-P450リダクターゼ以外のNADPH-P450リダクターゼを外部から加えて水酸化反応を行うことも可能である。

[0025] 上記8—10記載の形質転換体を使用する場合、形質転換細胞自身が產生する2,3-オキシドスクアレンを利用してオレアナン型トリテルペンが產生されるため、外部からオレアナン型トリテルペンを添加せずに、オレアナン型トリテルペン24位水酸化体を製造することができる。得られた24位水酸化体は酢酸エチルやエーテルなどの有機溶媒で抽出後、シリカゲルやODSを用いて精製する。

以下に本発明の実施例の概略を記載する。

[0026] ダイズ由来のEST及び機能未同定でかつ全長の塩基配列が報告されているシトクロームP450クローンを7種(GenBank Accesion Number:AF135485, Y10491, Y10982, Y10983, Y10493, AF022459、及び、TIGR Accesion Number:TC100921)選択した。このうち、本活性を示したCYP93E1(GenBank Accesion Number AF135485)に高い相同意を示した配列番号8のポリヌクレオチドについて、以下に記す。ダイズ芽生えより調製したmRNAから、RT-PCR法によりCYP93E1に対応するcDNA(配列番号8)を増幅し、酵母発現ベクターpESC-ER A(Stratagene社製)に組込み、ラノステロールシンターゼを欠いた酵母GIL77(Kushiro, T. et al., *Eur. J. Biochem.*, 256, 238-244, 1998)を形質転換し機能解析を行った。形質転換酵母の無細胞抽出液とβ-アミリンを反応させ、生成物をアセチル化し、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンを検出した。

[0027] 同様に、形質転換酵母の無細胞抽出液とソフォラジオールを反応させ、生成物をアセチル化し、GCMSで解析した。その結果、トリアセチルソヤサポゲノールBを検出した。

[0028] 形質転換酵母の培養にβ-アミリンを投与し、反応後、細胞を収穫した。脂溶性画

分を抽出し、アセチル化後、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-1-オレアネンを検出した。

[0029] 上記配列番号8のcDNA及びエンドウ由来 β -アミリン合成酵素遺伝子を酵母発現ベクターpESC-ERA (Stratagene社製)に組込み、ラノステロール合成酵素を欠いた酵母GIL77を形質転換し、2種の遺伝子を共発現させた。この形質転換酵母をGIL77/pESC-PSY-CYP93E1と命名し、平成16年2月6日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に受託番号FERM P-19675として寄託した(平成17年1月6日にFERM BP-10201に移管)。

[0030] 形質転換酵母を培養し、細胞を収穫した。脂溶性画分を抽出し、アセチル化後、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンを検出した。

[0031] 同様に、上記配列番号8のcDNA及びシロイヌナズナ由来混合トリテルペン合成酵素遺伝子を酵母発現ベクターpESC-ERA (Stratagene社製)に組込み、ラノステロールシンターゼを欠いた酵母GIL77を形質転換し、2種の遺伝子を共発現させた。

[0032] 形質転換酵母を培養し、細胞を収穫した。脂溶性画分を抽出し、アセチル化後、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンを検出した。他のジアセトキシトリテルペンは検出限界以下であった。

[0033] 以上の結果、該酵母において本来検出されないソフォラジオール及び β -アミリンの24位に対する水酸化活性が認められたことから、配列番号8はオレアナン型トリテルペンの24位水酸化酵素をコードする遺伝子であると明らかにすることができた。一方、同様に活性を調べた他の6種のP450遺伝子においては、本活性を検出することはできなかった。

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0034] (1)ダイズ芽生えのcDNAの調製
水浸14日後のダイズ(早生枝豆、アタリヤ農園)幼葉から、フェノール／クロロフォルム法により全RNAを抽出した。これを鑄型として、逆転写酵素SuperscriptII(

GIBCOBRL製)と、配列番号1に示すプライマーを用いてcDNAを調製した。

[0035] (2)配列番号8のポリヌクレオチドの増幅

上記(1)で調製したcDNAを鋳型とし、配列番号2と3に示す、ポリペプチドのN末端とC末端に相当する箇所のオリゴDNAをプライマーとして、アニール温度65°CでPCR(30サイクル、宝酒造社製Ex Taq DNAポリメラーゼ)を行い、CYP93E1(配列番号8)の全長クローンを得た。

[0036] (3)pESC-CYP93E1の構築及び形質転換酵母の作成

上記(2)で得られた全長クローンを制限酵素SpeIとClaIで処理し、酵母発現ベクターpESC-URA(Stratagene社製)のSpeIとClaIサイトに組み込んだ。これをpESC-C-CYP93Eとした。pESC-CYP93Eを、酵母INVSC2株(Invitrogen社)にFrozen-EZ Yeast Transformation II(Zymo Reaseach社)を用いて導入した。

[0037] (4)in vitro酵素活性試験

グルコースの代わりに2%ラフィノースを含むSC-U培地(Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990)20mlに形質転換酵母を植菌し、30°C、220rpmで18時間培養した。ヘミン(最終濃度13 μg/ml)とガラクトース(最終濃度2%)を加え、同条件でさらに20時間培養した。遠心により細胞を収穫し、2mlのスクリューバイアルへと移し、100 μlの抽出緩衝液(pH7.5の50mMリン酸カリウム緩衝液に10%スクロース、1mM EDTA及び14mMの2-メルカプトエタノールを加えたもの)を加え、再懸濁した。ここに希塩酸にて洗浄した0.4-0.6mm径のガラスビーズ(井内盛栄堂)を適量加えた。4°Cに冷却し、MINI-BEADBEADER(BIOSPEC社)を用いて細胞の破碎を行った。ここにさらに400 μlの抽出緩衝液を加えよく攪拌した後、4°Cに冷却しながら3500gで5分間遠心分離を行い、約400 μlの上清を粗酵素液として回収した。それに対し、100 μlの濃縮反応緩衝液(抽出緩衝液に10mM NADPH、75mM グルコース-6-リン酸(G6P)、2.5U/ml グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)を加えたもの)および5 μlの10mMのβ-アミリン・メタノール溶液を加えた。これを30°C、6時間反応させた。12N塩酸10 μlを添加した後、500 μlの酢酸エチルを用いて脂溶性成分の抽出を2回行い濃縮した。20 μlのピリジン及び

無水酢酸を加えて一晩放置することにより抽出物のアセチル化を行った。これに200 μ lの50%メタノール水溶液を加えて反応を停止し、200 μ lのヘキサンを用いて抽出を2回行い濃縮した(1))。対照実験として、2)pESC-URAを用いた形質転換体由来の粗酵素液を用いたもの、3)基質である β -アミリンを加えなかったもの、4)100°C、5分で熱処理した粗酵素液で反応を行ったもの、5)pESC-CYP93E1のGAL1プロモーター抑制のためガラクトースの代わりに同量のグルコースを加えたものについても同様の手法でサンプルを調製した。これを20 μ lのヘキサンに溶解し、1 μ lをGC-MS分析(島津製作所 ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010, カラム:RESTEK社 Rtx-5MS, 内径0.25mm 膜厚0.25 μ m 長さ30m, 昇温プログラム:230°Cで3分間ホールド、10°C/分で昇温、330°Cで8分間ホールド)に供した。全イオンモニター(TIM)、及び、m/z=218(3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンのベースピーク)のマスクロマトグラムで生成物の有無を解析した。TIMでは、3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの生成は認められなかった(結果未記載)。しかしながら、m/z=218のマスクロマトグラムにおいて3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンが、1)の条件で観測された(図1)。この結果よりCYP93E1翻訳産物は β -アミリンへの24位水酸化活性を有することを確認した。

次に、ソフォラジオールに対する反応性を検討するために、ソフォラジオール(5 μ l 10mM)を基質として、同様に酵素反応を行い、上記と同様にGCMS解析を行った。上記の1)の反応条件の生成物のマスクロマトグラム解析(m/z=216 トリアセチルソヤサポゲノールBのベースピーク)において、トリアセチルソヤサポゲノールBのピークが観測された(図2)。これより、CYP93E1翻訳産物は、 β -アミリンのみならず、ソフォラジオールに対しても、24位水酸化活性を有することが明らかとなった。

[0038] (5) *in vivo*酵素活性試験

グルコースの代わりに2%ラフィノースを含むSC-U培地20mlに形質転換酵母を植菌し、30°C、220rpmで18時間培養した。ヘミン(最終濃度13 μ g/ml)とガラクトース(最終濃度2%)を加え、さらに基質として10 μ lの10mMの β -アミリン・メタノール溶液を加えた。酸素を供給するために、ファルコンチューブの上部を綿栓で封じ、無菌的かつ好気的にさらに24時間培養した。遠心により細胞を収穫し、2mlのスクリ

ユーバイアルへ移した。これに250 μ lの40%水酸化カリウム水溶液及び250 μ lのメタノールを加え、十分に攪拌し、100°C、5分で熱処理した。500 μ lのヘキサンを用いて脂溶性成分の抽出を2回行い濃縮した。20 μ lのピリジン及び無水酢酸を加えて一晩放置することにより抽出物のアセチル化を行った。これに200 μ lの50%メタノール水溶液を加えて反応を停止し、200 μ lのヘキサンを用いて抽出を2回行い濃縮した(1))。対照実験として、2)pESC-URAを用いた形質転換体を用いたもの、3)基質である β -アミリンを加えなかったもの、4)pESC-CYP93E1のGAL1プロモーター抑制のためガラクトースの代わりに同量のグルコースをくわえたものについても同様の手法でサンプルを調製した。これを10 μ lのヘキサンに溶解し、1 μ lを(4)における条件と同条件でGC-MS分析に供した(条件は(4)の実験と同じ)。1)の条件において3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンのピークがTIMで観測され(図3)、かつ、そのピークのMS開裂パターンは標品と一致した(図4)。TIMのピーク面積比による定量結果から、本条件と同一の条件で1L培養した場合(約2mgの β -アミリンを投与)、数 μ gの3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンが得られることになる。

[0039] (6) 発現プラスミドpESC-PSYの構築

エンドウ由来の β -アミリン合成酵素PSY(AB034802、Eur. J. Biochem. 267, 3543-3460, 2000)を組み込んだプラスミドを鋳型に、配列番号4、5に示す、ポリペプチドのN末端とC末端に対応するオリゴDNAをプライマーとして、アニール温度58°CでPCR(30サイクル、宝酒造社製Ex Taq DNAポリメラーゼ)を行い、SalI及びNheIサイトをそれぞれN末、C末に導入したPSYの断片を得た。これをpESC-URAのSalIおよびNheIサイトに導入し、pESC-PSYを作成し、既知の手法(Eur. J. Biochem., 267, 3543-3460, 2000)により β -アミリン合成酵素活性を確認した。

[0040] (7) 発現プラスミドpESC-PSY-CYP93E1の構築および形質転換酵母の作成

pESC-PSY及びpESC-CYP93E1をSalI及びClaIで消化した。得られたPSYを含む断片とCYP93E1を含む断片を連結することにより、PSYとCYP93E1の共発現プラスミドpESC-PSY-CYP93E1を構築した。これを酵母GIL77株にFrozen-EZ Yeast Transformation IIを用いて導入し、形質転換体を得た。

[0041] (8) PSYおよびCYP93E1の共発現実験

炭素源として2%グルコースを含むSC-U培地20mlにヘミン(最終濃度13 μ g/ml)、エルゴステロール(最終濃度20 μ g/ml)、Tween80(最終濃度5mg/ml)を加えた培地へ形質転換した酵母を植菌し、30°C、220rpmで1日半培養した。培地を炭素源として2%ガラクトースを含むSC-U培地20mlにヘミン(最終濃度13 μ g/ml)、エルゴステロール(最終濃度20 μ g/ml)、Tween80(最終濃度5mg/ml)を加えた培地へと交換した後、さらに30°C、220rpmで1日培養した。細胞をpH7.5の50mMリン酸-カリウム緩衝液へ移し、ヘミン(最終濃度13 μ g/ml)及びグルコース(最終濃度3%)を加え、さらに30°C、220rpmで1日インキュベートした。(4)における実験手法と同様にアセチル化したGC-MS分析用サンプルを調製した。対照実験として、pESC-URAを用いた形質転換体、pESC-PSY、pESC-CYP93E1を用いた形質転換体を用いた形質転換体についても同様の手法でサンプルを調製した。これを1000 μ lのヘキサンに溶解し、1 μ lをGC-MS分析に供した(条件は(4)実験に同じ)。図5に示すようにpESC-PSY-CYP93E1形質転換酵母を用いた場合のみ3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンに対応するピークがTIMで観測された。ピーク面積比による定量解析の結果、本条件で1L培養した場合、数百 μ gの3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンが得られることになる。

[0042] (9) GIL77/pESC-PSY-CYP93E1の大量培養(1L)

500mlの三角フラスコに250mlの炭素源として2%ラフィノースを含むSC-U培地250mlにヘミン(最終濃度13 μ g/ml)、エルゴステロール(最終濃度20 μ g/ml)、Tween80(最終濃度5mg/ml)を加えた培地へ形質転換した酵母を植菌した。これを4本作成し、全量で1Lの培養を行った。30°C、220rpmで20時間培養したのち、ガラクトースを加え(最終濃度2%)、さらに30°C、220rpmで20時間培養した。細胞全量を100mlのpH7.5の50mMリン酸-カリウム緩衝液へ移し、ヘミン(最終濃度13 μ g/ml)及びグルコース(最終濃度3%)を加え、さらに30°C、220rpmで1日インキュベートした。

[0043] (10) GIL77/pESC-PSY-CYP93E1の1L培養から生成物の単離

(9)で得た培養から遠心により細胞を収穫し、50mlの40%水酸化カリウム水溶液及び50mlのメタノールを加え、1時間加熱還流を行った。50mlのヘキサンを用い脂

溶性画分の抽出を行った。ヘキサン画分は50mlの飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で3回十分に洗浄した。この操作を3回繰り返し抽出を行い、約23mgの脂溶性画分を得た。

これを2段階のシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。まず、上記脂溶性画分をベンゼンに溶解し、シリカゲルFC-40(4g、和光純薬)、ヘキサン・酢酸エチル溶媒系を用いて精製した。次に、当該画分をシリカゲルFC-40(2g)及びベンゼン・酢酸エチル溶媒系を用いて精製し、0.55mgの3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンを得た。

[0044] (11) 発現プラスミドpESC-YUP43の構築

シロイヌナズナ由来の β -アミリンを含む9種のトリテルペンを与える多機能型トリテルペン合成酵素YUP43(Tetrahedron lett., 41, 7705-7710, 2000)を組み込んだプラスミドを鋳型とし、配列番号6、7に示す、ポリペプチドのN末端とC末端に相当するオリゴDNAをプライマーとして、PCR(アニール温度58°C、30サイクル、宝酒造社製Ex Taq DNAポリメラーゼ)を行い、SalI及びNheIサイトをそれぞれN末、C末に含むYUP43の断片を得た。これをpESC-URAのSalIおよびNheIサイトに導入し、pESC-YUP43を作成し、既知の手法(Tetrahedron lett., 41, 7705-7710, 2000)により多機能型トリテルペン合成酵素活性を確認した。

[0045] (12) 発現プラスミドpESC-YUP43-CYP93E1の構築および形質転換酵母の作成

pESC-YUP43及びpESC-CYP93E1をSalI及びClaIで消化した。YUP43を含む断片とCYP93E1を含む断片を連結することによりYUP43とCYP93E1を共発現させるプラスミドpESC-YUP43-CYP93E1を構築した。これを酵母GIL77株にFrozen-EZ Yeast Transformation IIを用いて導入し、形質転換体を得た。

[0046] (13) YUP43および配列番号8のポリヌクレオチドの転写・翻訳産物のポリペプチドの共発現実験

(8)と同様の手法により、pESC-URA、pESC-YUP43、pESC-CYP93E1、pESC-YUP43-CYP93E1、それによる形質転換体についてサンプルを調製した。これらを1000 μ lのヘキサンに溶解し、1 μ lをGC-MS分析に供した(条件は(4

)実験に同じ)。図7に示すようにpESC-YUP43-CYP93E1形質転換酵母を用いた場合のみ、TIMにおいて 3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンのピークが観測された。YUP43における β -アミリンの生産量がPSYのものより低いため、 3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの產生量はpESC-PSY-CYP93E1形質転換体と比較して低下した。一方、他のトリテルペン(ルペオール、ブチロスペルモール、チルカラジエノール、タラキサステロール、シードタラキサステロール、バウレエレノール、 α -アミリン、マルチフロレノール)の水酸化体と考えられるピークは検出限界以下であった。

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができるることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2004年2月25日出願の日本特許出願(特願2004-049123)に基づくものであり、その内容はここに参考として取り込まれる。

産業上の利用可能性

[0047] 本発明により、オレアネン型トリテルペンの24位を水酸化する酵素を遺伝子工学的に取り扱うことが可能となった。従って、当該水酸化酵素遺伝子を組み込んだ細胞を用い、例えば酵母などによる水酸化酵素の生産、水酸化反応の利用、植物トリテルペンの微生物生産などに利用可能である。また、水酸化酵素の遺伝子を植物に組み込むことによりソヤサポゲノールなどのトリテルペンの生産を増大させる等、農業分野での利用可能性がある。

図面の簡単な説明

[0048] [図1]は配列番号8の翻訳産物による β -アミリンの24位水酸化活性(*in vitro*)を示す。さらに詳しくは、生成物をアセチル化後GCMSで解析したm/Z=218をモニターしたマスクロマトグラムを表す。A-Fは以下の結果を示す。 A: 3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの標品 B:pESC-CYP93E1による形質転換酵母から調製した粗酵素液と β -アミリンをNADPH再生システム共存下反応させて得られる生成物 C:Bの反応系から β -アミリンを除いて反応させた生成物 D:Bの反応において、熱変性させた粗酵素液を用いて反応させた生成物 E:pESC-CYP93E1による

形質転換酵母を、グルコースを添加して培養。他はBと同一条件。 F:ボイドベクターpESC-URAによる形質転換酵母から調製した粗酵素液を使用。他はBと同一条件。

[図2]は配列番号8の翻訳産物によるソフォラジオール24位水酸化活性(*in vitro*)を表す。さらに詳しくは、生成物をアセチル化後GCMSで解析したm/Z=216をモニターしたマスクロマトグラムを表す。A～Fは以下の結果を示す。 A:トリアセチルソヤサポゲノールBの標品 B:pESC-CYP93E1による形質転換酵母から調製した粗酵素液と β アミリンをNADPH再生システム共存下反応させて得られた生成物 C:Bの反応系からソフォラジオールを除いて反応させた生成 D:Bの反応において、熱変性させた粗酵素液を用いて反応させた生成物 E:pESC-CYP93E1による形質転換酵母を、グルコースを添加して培養。他はBと同一条件。 F:ボイドベクターpESC-URAによる形質転換酵母から調製した粗酵素液を使用。他はBと同一条件。

[図3]は配列番号8の翻訳産物による β -アミリンに対する24位水酸化活性(*in vivo*)生成物を示す。さらに詳しくは、生成物をアセチル化後GC-MSで解析したTIMによるクロマトグラムを示す。A～Eは以下の結果を示す。 A:3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの標品(20pmol) B:pESC-CYP93E1による形質転換酵母に β -アミリンを投与して得られた生成物 C: β -アミリンを投与しない場合。他はBと同じ。 D:形質転換酵母を、グルコースを添加して培養。他はBと同一条件。 E:ボイドベクターpESC-URAによる形質転換酵母 β -アミリンを投与。他はBと同一条件。

[図4]は、配列番号8の翻訳産物の β -アミリン24位水酸化活性(*in vivo*)を示す。AおよびBは以下の結果を示す。 A:図3のBにおいて検出した保持時間15. 35分のピークのマススペクトル B:図3のA(3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの標品)のマススペクトル

[図5]はCYP93E1と β -アミリン合成酵素(PSY)の共発現による3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンの生産を示す。さらに詳しくは、各形質転換酵母(GIL77)から得られた脂溶性画分をアセチル化し、GCMS解析によるTIMによるクロマトグラムを示す。A～Eは以下の結果を示す。 A:3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの

標品 (20pmol) B:pESC-PSY-CYP93E1による形質転換酵母の抽出物 C:
pESC-PSYによる形質転換酵母の抽出物 D:pESC-CYP93E1による形質転
換酵母の抽出物 E:pESC-URAによる形質転換酵母の抽出物

[図6]はGIL77/pESC-PSY-CYP93E1の1L培養から得た生成物の¹H-NMR
を示す。

[図7]は配列番号8の翻訳産物と多機能型トリテルペン合成酵素(YUP43)の共発現
による3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンの生産を示す。さらに詳しくは、各形質
転換酵母(GIL77)から得られた脂溶性画分をアセチル化し、GCMS解析における
TIMによるクロマトグラムを示す。A-Eは以下の結果を示す。 A:3 β , 24-ジア
セトキシ-12-オレアネンの標品 (20pmol) B:pESC-YUP43-CYP93E1によ
る形質転換酵母の抽出物 C:pESC-YUP43による形質転換酵母の抽出物 D
:pESC-CYP93E1による形質転換酵母の抽出物 E:pESC-Uraによる形質転
換酵母の抽出物

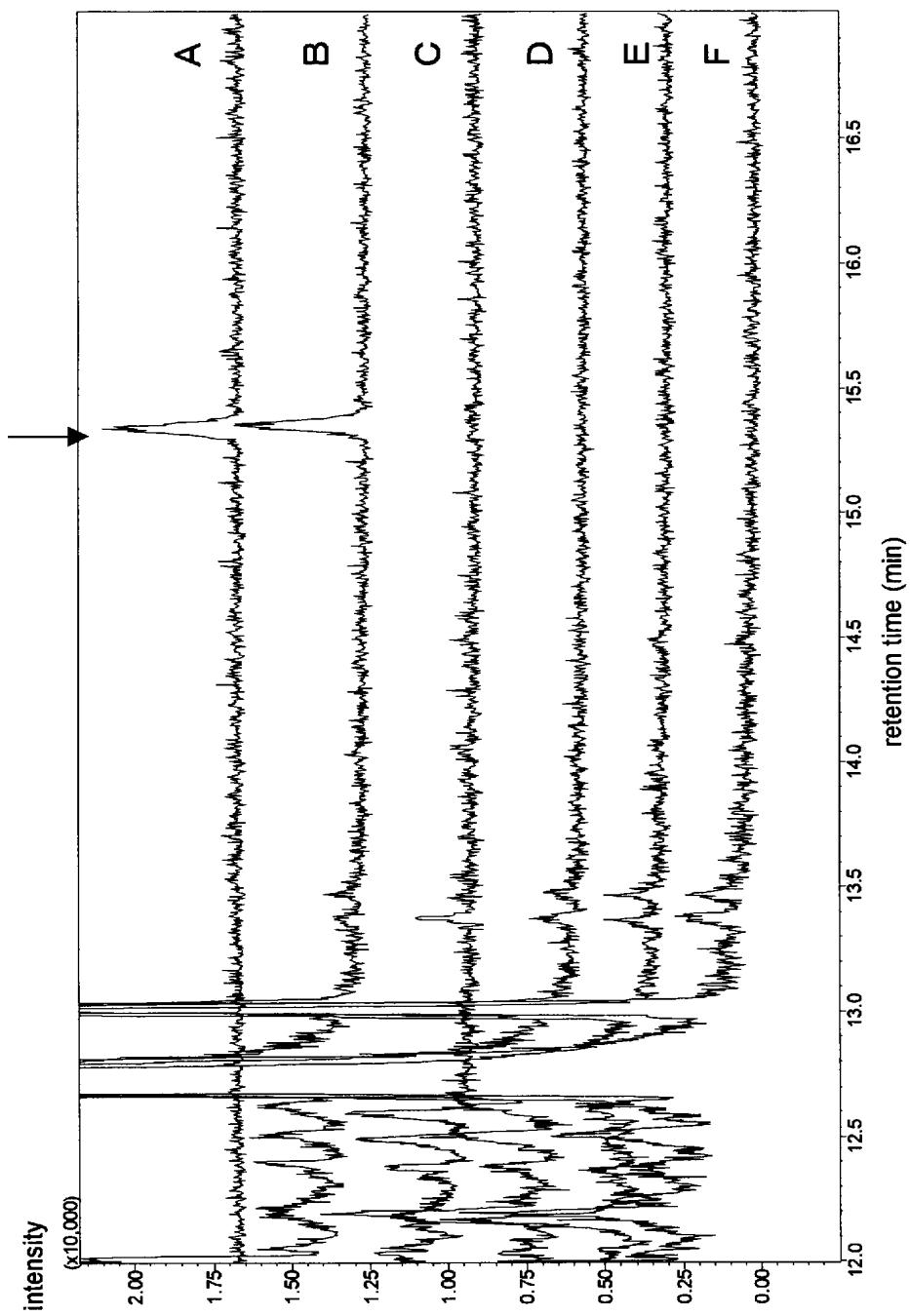
請求の範囲

- [1] 配列番号8で表されるポリヌクレオチドの相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
- [2] ポリヌクレオチドが配列番号8で表されるポリヌクレオチドである請求項1に記載の発現ベクター。
- [3] 請求項1または2記載の発現ベクターで宿主を形質転換した形質転換体。
- [4] 宿主が微生物である請求項3記載の形質転換体。
- [5] 微生物が酵母である請求項4記載の形質転換体。
- [6] 配列番号8で表されるポリヌクレオチドの相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび β -アミリン合成酵素遺伝子を有する発現ベクター。
- [7] ポリヌクレオチドが配列番号8で表されるポリヌクレオチドである請求項6に記載の発現ベクター。
- [8] 請求項6または7記載の発現ベクターで宿主を形質転換した形質転換体。
- [9] 宿主が微生物である請求項8記載の形質転換体。
- [10] 微生物が酵母である請求項9記載の形質転換体。
- [11] 受託番号FERM BP-10201として寄託されているラノステロール合成酵素欠損酵母変異株。
- [12] 請求項3から5のいずれかに記載の形質転換体を培養して、請求項1に記載のポリペプチドを產生する工程を含むオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドを製造する方法。
- [13] 請求項8から10のいずれかに記載の形質転換体を培養して、
 - 1) 請求項3に記載のポリペプチドを產生する工程および
 - 2) β -アミリン合成酵素を產生する工程

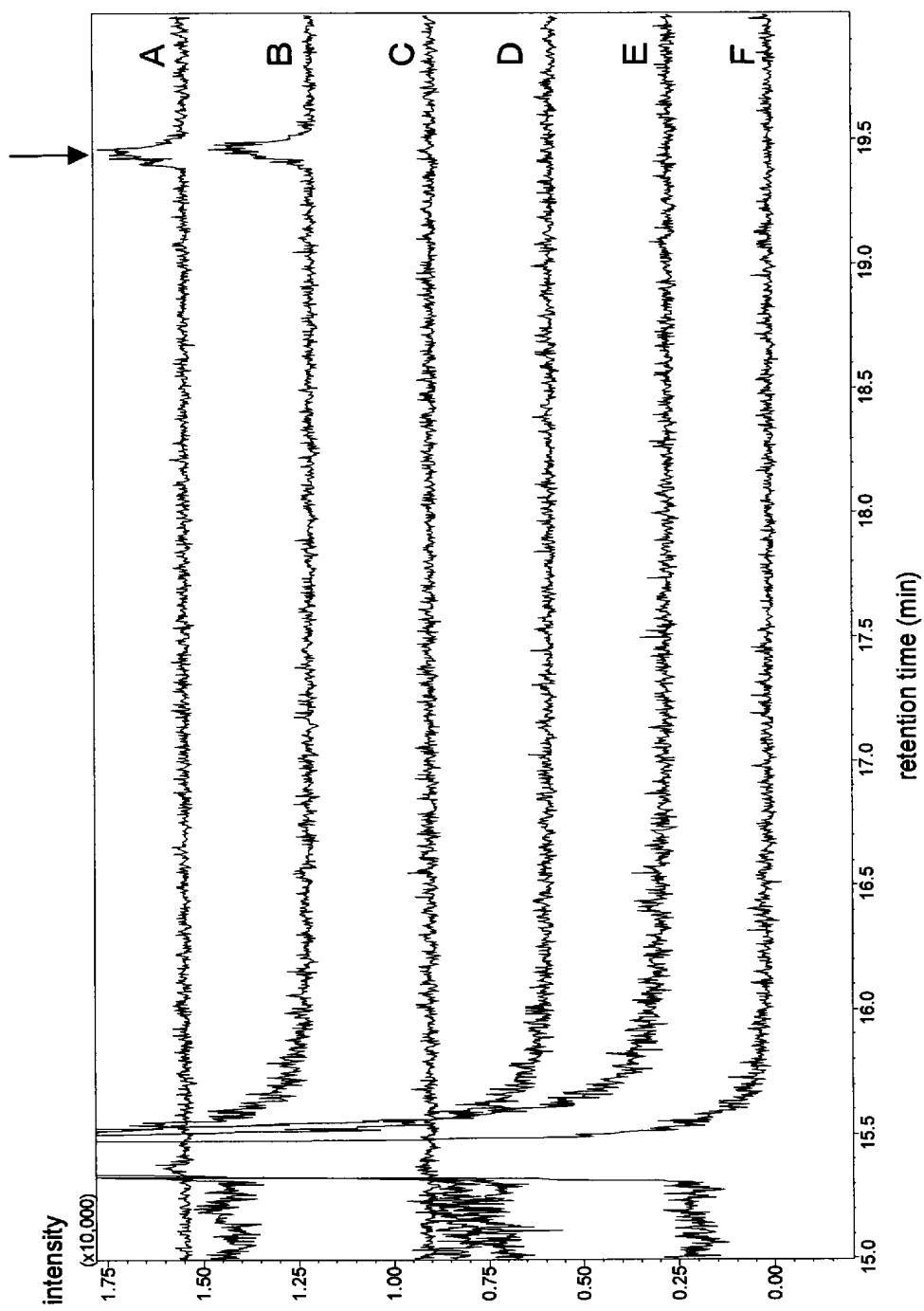
を含むオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する活性を有するポリペプチドおよび β -アミリン合成酵素を製造する方法。

- [14] 請求項3から5のいずれかに記載の形質転換体をオレアナン型トリテルペンに作用させる工程を含む24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンの製造方法。
- [15] 請求項8から10のいずれかに記載された形質転換体の培養生産による24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンの製造方法。
- [16] 請求項11に記載の酵母変異株の培養生産による24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンの製造方法。

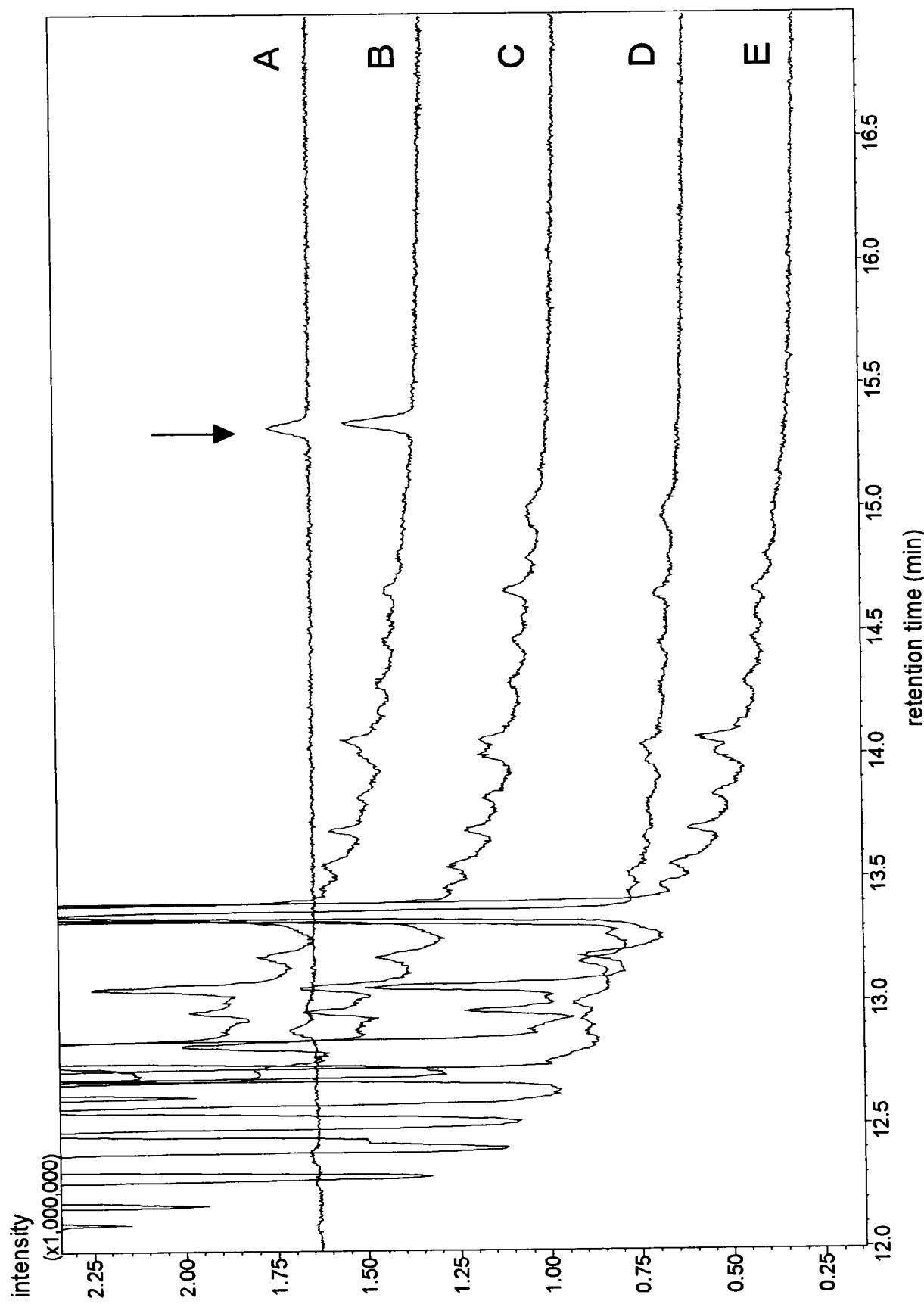
[図1]



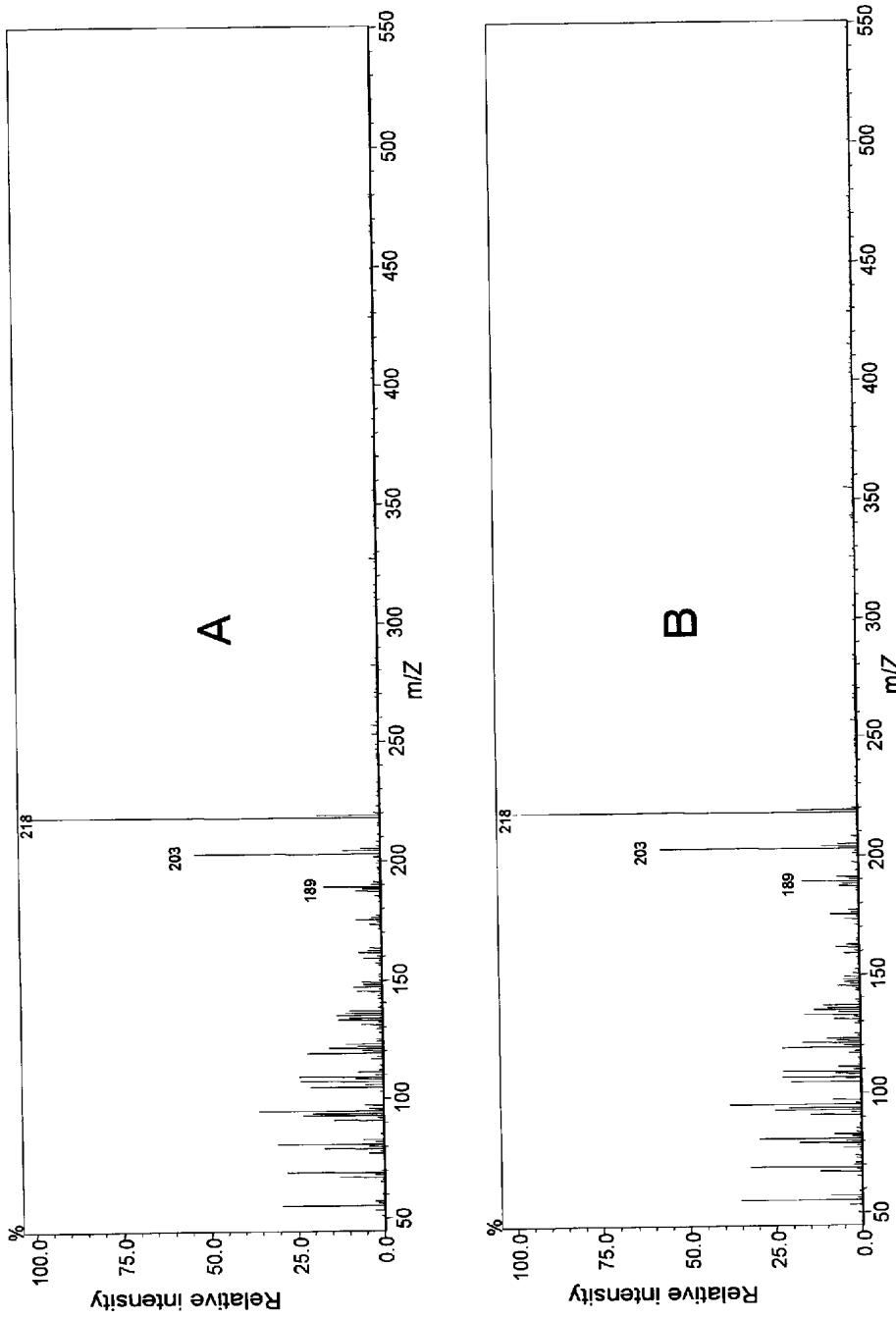
[図2]



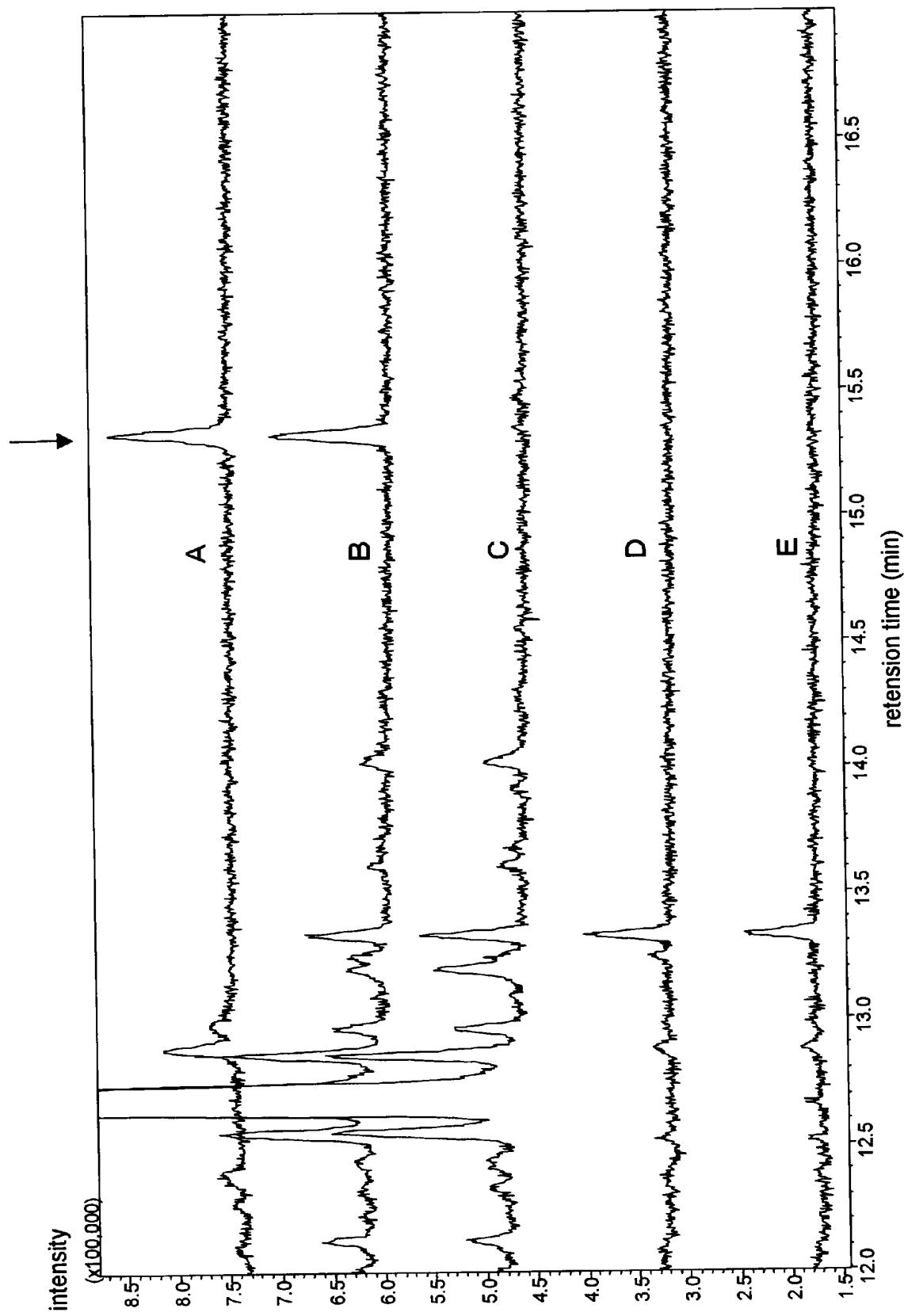
[図3]



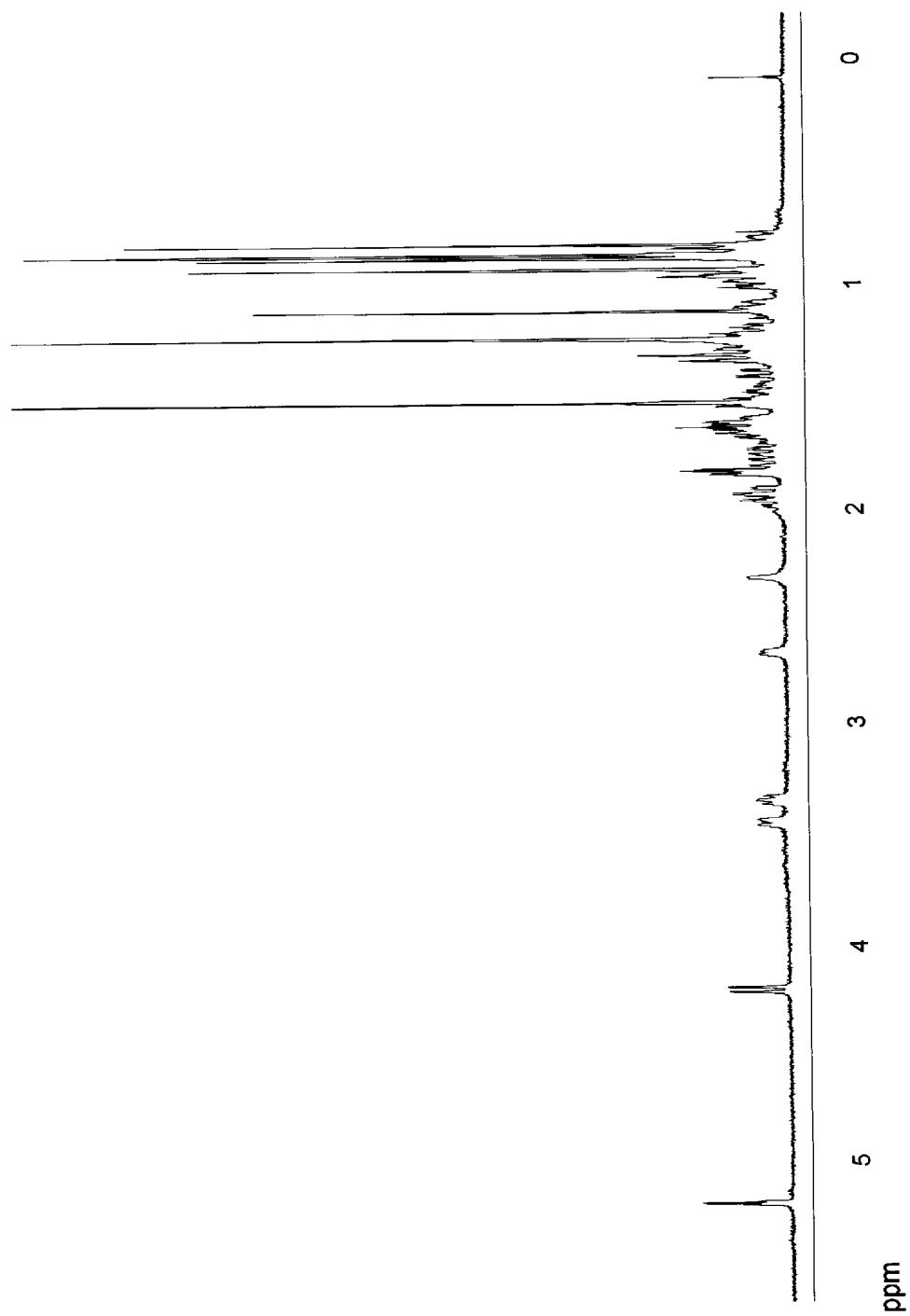
[図4]



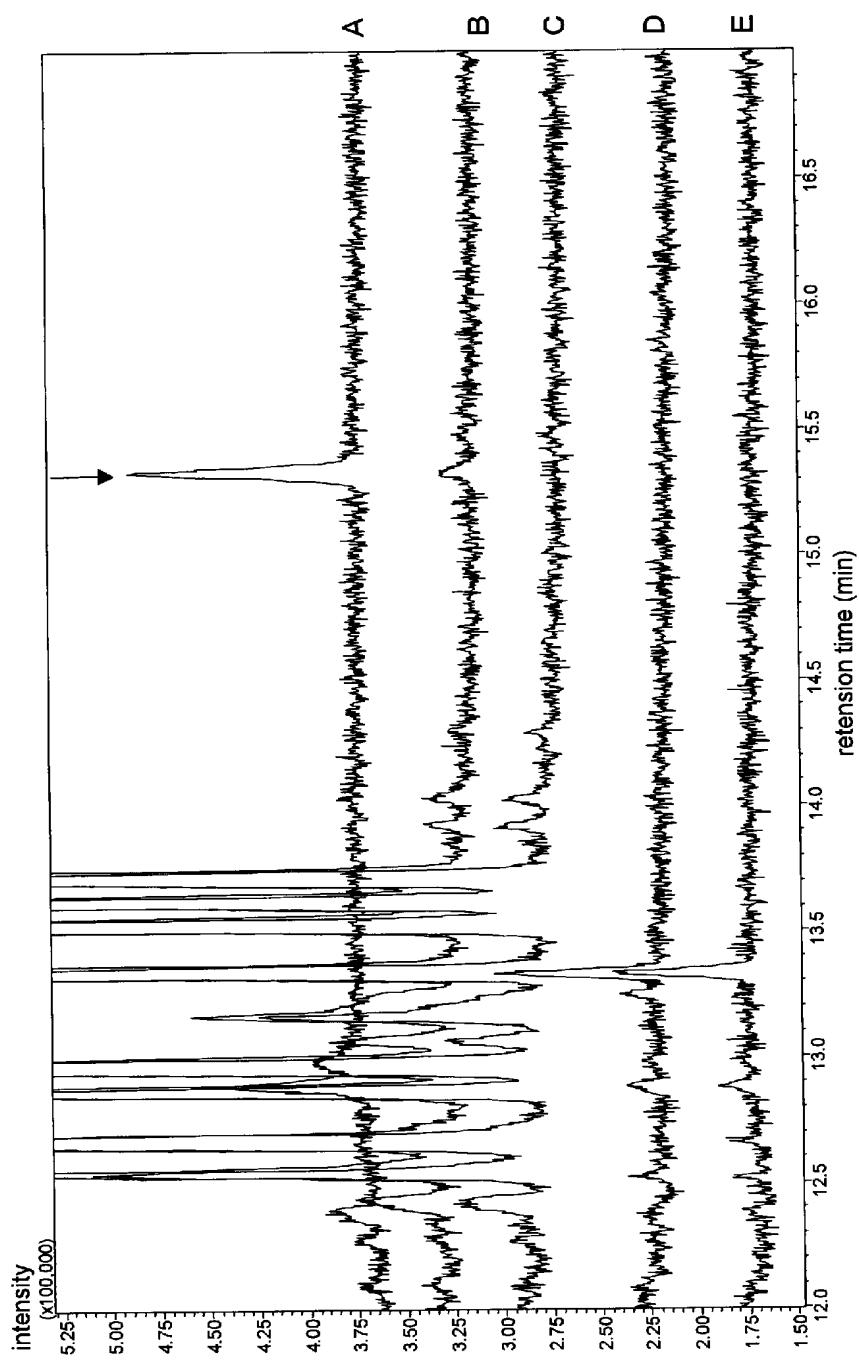
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N1/19, C12N9/02, C12N9/00, C12P33/06// (C12N15/53, C12R1:91), (C12N1/19, C12R1:645), (C12N9/02, C12R1:645), (C12P33/06, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-90, 1/00-38, 900-99, C12P33/00-20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Steele CL. et al., "Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavanoid biosynthesis in soybean.", Arch.Biochem.Biophys., Vol.367, No.1, pages 146 to 150 (1999)	1-16
Y	WO 02/086142 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 31 October, 2002 (31.10.02), (Family: none)	1-16
Y	HAYASHI H. et al., "Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licorice cells.", Phytochemistry, Vol.34, No.5, pages 1303 to 1307, (1993)	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 May, 2005 (09.05.05)

Date of mailing of the international search report
24 May, 2005 (24.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷C12N15/53, C12N1/19, C12N9/02, C12N9/00, C12P33/06 // (C12N15/53, C12R1:91)
(C12N1/19, C12R1:645), (C12N9/02, C12R1:645), (C12P33/06, C12R1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷

C12N15/00-90, 1/00-38, 9/00-99, C12P33/00-20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Steele CL. et.al., "Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavanoid biosynthesis in soybean.", Arch. Biochem. Biophys., vol.367, no.1, p.146-150, (1999)	1-16
Y	WO 02/086142 A (明治製菓株式会社) 2002.10.31 ファミリーなし	1-16
Y	Hayashi H. et.al., "Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licorice cells.", Phytochemistry, vol.34, no.5, p.1303-1307, (1993)	1-16

〔 C 欄の続きにも文献が列挙されている。

〔 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 09.05.2005	国際調査報告の発送日 24.5.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 斎藤 真由美	4B 3539

電話番号 03-3581-1101 内線 3448